

PCT/ E S 00 / 00245

REC'D 09 OCT 2000

WIPO

PCT

OFICINA ESPAÑOLA

#500/245
de

10/031047

PATENTES y MARCAS

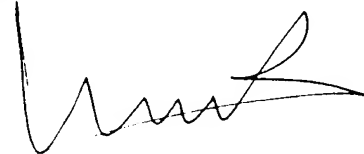
CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9901557, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 12 de Julio de 1999.

Madrid, 1 de agosto de 2000

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.



M. MADRUGA

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD	99 JUL 12 12:27 FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO OEPM
(3) LUGAR DE PRESENTACION MADRID		CODIGO 28

(4) SOLICITANTES(S) LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A.	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. SECRETARIA GENERAL	NOMBRE	DNI A-08-037236
--	--	--------	--------------------

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE DOMICILIO Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221 LOCALIDAD BARCELONA PROVINCIA BARCELONA PAIS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑOLA	Panamá, 1 - Madrid 28071 TELEFONO CODIGO POSTAL 08041 CODIGO PAIS ES CODIGO NACION ES
---	---

(6) INVENTORES FRESNO ESCUDERO IÑIGUEZ PENA	(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE MANUEL MIGUEL ANGEL	NACIONALIDAD ESPAÑOLA ESPAÑOLA	COD. NACION ES ES

(9) TITULO DE LA INVENCION LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU EMPLEO EN LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE COX-2
--

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(11) EXPOSICIONES OFICIALES LUGAR	FECHA
--------------------------------------	-------

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(14) REPRESENTANTE DOMICILIO C/ Alcalá, 21	APELLIDOS CARPINTERO LOPEZ	LOCALIDAD MADRID	NOMBRE FRANCISCO	CODIGO 4030	PROVINCIA MADRID	COD. POSTAL 28014
---	-------------------------------	---------------------	---------------------	----------------	---------------------	----------------------

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. Nº DE PAGINAS..... 22 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. Nº DE PAGINAS. 4 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PAGINAS..... 8 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input checked="" type="checkbox"/> OTROS	FIRMA DEL FUNCIONARIO FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE
---	--	--

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

~~145933~~

FECHA DE PRESENTACION

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU EMPLEO EN LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE COX-2

La línea celular comprende una construcción de DNA que comprende la totalidad o parte de una secuencia promotora del gen de la ciclooxigenasa 2 (cox-2) y un gen testigo, unidos operativamente entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión de dicho gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado. El método de ensayo comprende poner en contacto dicha línea celular con el compuesto a ensayar y determinar la existencia de una señal indicativa de la expresión de actividad debida al gen testigo. Este método es adecuado para la búsqueda de inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por estímulos apropiados.

GRAFICO



DATOS DE PRIORIDAD

(31) NUMERO

(32) FECHA

(33) PAIS

A1 (12) PATENTE DE INVENCION

(21) NUMERO DE SOLICITUD

P 9 9 0 1 5 5 7

(22) FECHA DE PRESENTACION

(71) SOLICITANTE (S)
LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A.

NACIONALIDAD
ESPAÑOLA

DOMICILIO Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221
BARCELONA 08041 BARCELONA

(72) INVENTOR (ES) FRESNO ESCUDERO MANUEL
IÑIGUEZ PENA MIGUEL ANGEL

(73) TITULAR (ES)

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA
CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU
EMPLEO EN LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE
LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE COX-2

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA CICLOOXIGENASA-
2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU EMPLEO EN LA BÚSQUEDA DE
INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE COX-2

La línea celular comprende una construcción de DNA que comprende la totalidad o parte de una secuencia promotora del gen de la ciclooxygenasa 2 (cox-2) y un gen testigo, unidos operativamente entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión de dicho gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado. El método de ensayo comprende poner en contacto dicha línea celular con el compuesto a ensayar y determinar la existencia de una señal indicativa de la expresión de actividad debida al gen testigo. Este método es adecuado para la búsqueda de inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por estímulos apropiados.

LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU EMPLEO EN LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE COX-2

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona, en general, con la búsqueda de productos con potenciales aplicaciones terapéuticas. En particular, la invención se refiere a un método para la búsqueda de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la ciclooxigenasa-2 que comprende el empleo de una línea celular que expresa de forma estable una construcción de DNA en la que la secuencia promotora del gen de la ciclooxigenasa-2 dirige la expresión de un gen testigo en respuesta a los estímulos apropiados.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ciclooxigenasa (cox) es una enzima implicada en numerosos procesos. Se conocen dos isoformas de la cox, la ciclooxigenasa 1 (cox-1) y la ciclooxigenasa 2 (cox-2). Aunque ambas isoformas están relacionadas con la producción de prostaglandinas involucradas en procesos fisiológicos, parece ser que la cox-2 es la isoforma predominante implicada en diversas patologías como la inflamación, la carcinogénesis, la angiogénesis y algunos procesos neurodegenerativos.

La inducción a nivel transcripcional de la cox-2 se produce en respuesta a numerosos factores, entre los que se encuentran, la expresión de oncogenes, el tratamiento con promotores de tumores, mitógenos, estímulos proinflamatorios, factores de crecimiento y citoquinas [revisado en Smith and DeWitt, 1996; Griswold and Adams, 1996; Jouzeau et al., 1997 (véase el apartado relativo a la BIBLIOGRAFÍA)]. En la mayoría de los casos la inducción de esta enzima se traduce en un aumento en la síntesis de prostaglandinas, aunque no se pueden descartar otros modos de actuación.

35 La capacidad de ciertas drogas de la familia de los

antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) de inhibir la cox-2 explica sus efectos terapéuticos [revisado en Smith and DeWitt, 1996; Griswold and Adams, 1996; Jouzeau et al., 1997]. Asimismo, existen evidencias crecientes de que la inhibición de la cox-2 tanto por NSAIDs como por glucocorticoides o por ciclosporina A posee propiedades inmunosupresoras [Iñiguez et al., 1998; Hall and Wolf, 1997; Zhou et al., 1994; y las revisiones citadas anteriormente]. Otras acciones de la inducción de la cox-2 se refieren a la implicación de ésta en cáncer, angiogénesis y procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. Se ha comprobado que tanto la inhibición de la inducción a nivel transcripcional cox-2 como la inhibición enzimática de la cox-2 atenúan estos procesos [Shiff et al., 1996; Tsujii et al., 1997 y 1998; Subbaramiah et al., 1998; Pasinetti, 1998].

Tras el descubrimiento de la isoforma inducible cox-2 de la enzima ciclooxigenasa, los métodos de identificación de nuevos fármacos antiinflamatorios han tenido como objetivo seleccionar compuestos inhibidores selectivos de la actividad enzimática cox-2 frente a la isoforma constitutiva cox-1. Existen varios tipos de sistemas al respecto. Unos utilizan ensayos *in vitro* utilizando enzima cox-2 purificada o semipurificada [Famaey, 1997; Noreen et al., 1998]. Otros autores utilizan líneas celulares animales o humanas que expresan predominantemente la isoforma cox-2 en condiciones naturales o tras la inducción con estímulos [Famaey, 1997; Berg et al., 1997]. Algunos emplean líneas celulares de origen animal o humano en las que sobreexpresan la proteína cox-2 mediante transfección estable del cDNA de la misma [Lora et al., 1997; O'Neill et al., 1995; Cromlish and Kennedy, 1996]. En algún caso se ha llegado a determinar mediante el análisis del mRNA si tales compuestos inhiben a nivel transcripcional la inducción de la cox-2 [Tao et al., 1998; Subbaramiah et al., 1998]. También se han establecido sistemas de estudio de compuestos inhibidores mediante ensayos *in vivo*, ya sea con sangre entera o con células purificadas de donantes sanos [Famaey, 1997;

Brideau et al., 1996].

En cualquier caso, la mayor limitación de estos sistemas radica en que permiten seleccionar compuestos inhibidores de la actividad enzimática de la enzima cox-2, sin atender a sus efectos sobre la inducción de la producción de la proteína, paso previo a la producción de prostaglandinas por esta enzima. Además de esta limitación, ha quedado demostrado que las potencias relativas de estos compuestos varían para el mismo fármaco entre diferentes tipos de ensayos. Asimismo, un aspecto importante a considerar tiene que ver con la inhibición de la actividad cox-2 fisiológica, que también se vería inhibida por el tipo de compuestos identificados por los sistemas mencionados, lo que podría derivar en efectos secundarios adversos.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un método para la búsqueda de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por diferentes estímulos que supere los inconvenientes arriba mencionados.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona una solución a la necesidad existente que consiste en el desarrollo de un sistema de ensayo para la búsqueda de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por diferentes estímulos. Este criterio permite seleccionar compuestos que inhiben la producción de la cox-2, con lo que actuarán como inhibidores de las acciones derivadas del incremento de la expresión de la cox-2 y del consiguiente aumento de la producción de prostaglandinas que desencadenan diversos procesos patológicos. Entre otros procesos, se pueden destacar procesos inflamatorios, proliferación celular incontrolada, angiogénesis, carcinogénesis y patologías neurodegenerativas, tal y como se describió anteriormente. El criterio para la selección de compuestos según esta invención radica en la inhibición de la actividad inducible del promotor de la cox-2, con lo cual no se

seleccionarán aquellos compuestos que inhiban la actividad basal fisiológica de producción de la cox-2.

Para el desarrollo de la solución aportada por esta invención, ha sido necesario construir una línea celular que expresa de forma estable una construcción de DNA en la que la secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión del gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado. La regulación de la expresión del gen de la cox-2 viene determinada por la actividad reguladora de su promotor, mientras que la medida de la actividad del gen testigo proporciona una medida indirecta de la actividad del promotor de la cox-2 en respuesta a diferentes agentes.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye una construcción de DNA (o DNA recombinante) que comprende una secuencia promotora del gen de la cox-2 y un gen testigo, operativamente unidos entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen dirige la expresión del gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un vector, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende dicha construcción de DNA.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una línea celular que contiene dicha construcción de DNA, o dicho plásmido que contiene dicha construcción de DNA, y la expresa de forma estable.

Finalmente, otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la búsqueda de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la ciclooxygenasa-2 que comprende el empleo de dicha línea celular que expresa de forma estable dicha construcción de DNA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la secuencia de la zona promotora del gen cox-2. Las flechas indican las secuencias de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR [reacción

en cadena de la polimerasa].

La Figura 2 muestra la estrategia de clonaje de la región promotora del gen *cox-2* en el plásmido pXP2 para obtener la construcción prom2-1906-LUC.

5 La Figura 3 muestra los resultados del análisis por RT-PCR [transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa] de la expresión del mRNA de *cox-2* en células Jurkat. En la Figura 3(A) se muestra el efecto del tratamiento con PMA y con PMA + Ionóforo de calcio A23187, en adelante PMA+Ion, en la expresión
10 del mRNA de *cox-2*. En la Figura 3(B) se muestra la inhibición por ciclosporina de la inducción transcripcional de *cox-2*. Como control en ambos casos se muestra el resultado obtenido para los mRNAs no inducibles de la isoforma *cox-1* y de la glicerol-aldehído deshidrogenasa (GAPDH).

15 La Figura 4 muestra el resultado de la estimulación por PMA o por PMA+Ion de la actividad luciferasa en células Jurkat transfectadas transitoriamente con la construcción prom2-1906-LUC. Como control se comprueba que tanto la construcción prom1-898-LUC como el plásmido vacío pXP2 no son inducibles.

20 La Figura 5 muestra el resultado de la inhibición por ciclosporina A (CsA) de la estimulación causada por PMA+Ion de la construcción prom2-1906-LUC en la transfección transitoria en células Jurkat.

25 La Figura 6 muestra los resultados de un experimento de transfección transitoria con la construcción prom2-1906-LUC y tratamiento con dexametasona.

La Figura 7 muestra los resultados de la actividad luciferasa de los diferentes clones obtenidos tras la transfección estable con la construcción prom2-1906-LUC.

30 La Figura 8 muestra los resultados de la inhibición por ciclosporina A (CsA) de la estimulación por PMA+Ion de la actividad luciferasa de los clones estables de Jurkat-1906LUC.

35 La Figura 9 muestra los resultados obtenidos para la inhibición por el glucocorticoide Dexametasona (Dex) sobre la estimulación por PMA+Ion de la actividad luciferasa de los

clones estables de Jurkat-1906LUC.

La Figura 10 muestra la inhibición por Resveratrol (Res) de la inducción de la actividad luciferasa de los clones estables como control del sistema de ensayo.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona una construcción de DNA (o DNA recombinante) que comprende la totalidad o parte de una secuencia promotora del gen de la ciclooxigenasa 2 (cox-2) y un
10 gen testigo, operativamente unidos entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión de dicho gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado.

La secuencia promotora del gen cox-2 puede tener cualquier origen, aunque preferentemente dicha secuencia procederá del gen
15 humano de la cox-2.

Como gen testigo puede utilizarse cualquier gen testigo capaz de producir una señal fácilmente detectable, de los habitualmente utilizados en este tipo de ensayos de trasfección, por ejemplo, el gen de la cloranfenicol acetil transferasa
20 (CAT), el gen de la beta galactosidasa (β -gal), el gen de la luciferasa, por ejemplo, de luciérnaga o de *Renilla*. En una realización particular de esta invención dicho gen testigo es el gen de la luciferasa de luciérnaga por la extrema
25 sensibilidad, rapidez, facilidad y bajo coste del ensayo de detección de la misma.

La invención también proporciona un vector, tal como un plásmido o un vector de expresión, que contiene la construcción de DNA previamente mencionada. En principio, puede utilizarse cualquier vector apropiado para insertar en él dicha
30 construcción de DNA. Estos vectores son útiles para transformar células.

La línea celular proporcionada por esta invención comprende, y expresa de forma estable, dicha construcción de DNA que comprende la totalidad o parte de una secuencia promotora
35 del gen de la cox-2 y un gen testigo, operativamente unidos

entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión de dicho gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado.

La línea celular transformada que contiene la construcción de DNA previamente mencionada puede proceder de cualquier línea celular adecuada capaz de expresar de forma estable dicha construcción de DNA, por ejemplo, de una línea celular de origen humano tal como una línea de células de tipo linfocito T, células Hep-G2 derivadas de un carcinoma hepatocelular, células Hela derivadas de un adenocarcinoma de cervix, células tipo monocito-macrófago, por ejemplo, las líneas U937 y THP-1, etc. En una realización particular de esta invención, se ha seleccionado la línea celular Jurkat (descrita originalmente por Schneider et al., 1977) como ejemplo representativo de una línea celular transformada de tipo linfocito T como modelo de estudio de la expresión de un gen relacionado con la respuesta inmune. Además, dicha línea celular es fácil de crecer y proporciona un elevado rendimiento de células por unidad de tiempo y por volumen (ml) de cultivo.

La línea celular proporcionada por esta invención puede utilizarse como sistema de ensayo para la búsqueda e identificación (screening) de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por diferentes estímulos.

La línea celular proporcionada por esta invención puede obtenerse fácilmente mediante procedimientos convencionales de Ingeniería Genética, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende (i) el aislamiento de la secuencia promotora del gen de la cox-2, (ii) el clonaje de dicha secuencia en un vector que contiene el gen testigo, en una posición en la que dicha secuencia promotora es capaz de dirigir la expresión de dicho gen testigo, y (iii) la transfección de una línea celular adecuada con dicho plásmido. En el Ejemplo 3 se describe detalladamente una forma concreta de obtener unos clones individuales de células Jurkat transformadas que expresan el gen

testigo (luciferasa) de forma estable, denominados Jurkat-C3-1906LUC, Jurkat-F9-1906LUC y Jurkat-C7-1906LUC, en los que se determinó la actividad luciferasa basal y se comprobó que la expresión del gen testigo (luciferasa) se inducía en respuesta a los mismos estímulos que el promotor de la cox-2 tal y como se había establecido previamente con células transfectadas transitoriamente.

El sistema de ensayo (línea celular) proporcionado por esta invención ha sido validado previamente mediante la transfección transitoria de la construcción prom2-1906-LUC y el análisis de la actividad luciferasa bajo estímulos e inhibidores diferentes. Los resultados obtenidos se compararon con un control no inducible de una construcción similar en la que en lugar del promotor de la cox-2 se sitúa el promotor de la isoforma cox-1 y con el vector vacío pXP2. También se ha procedido a determinar, bajo los mismos estímulos el comportamiento del gen endógeno cox-2 mediante experimentos de RT-PCR en los que se analiza la expresión del mRNA. Como control no inducible se determinó el comportamiento del gen endógeno de la isoforma cox-1 y del gen no inducible de la glicerol-aldehído-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los principales tratamientos fueron con activadores tales como el éster de forbol PMA (10 ng/ml) y con la combinación de PMA y el Ionóforo de calcio A23187 [PMA+Ion] (1 μ M). El tratamiento con fármacos inhibidores de la inducción por PMA+Ion se llevó a cabo con dexametasona (1 μ M), y con ciclosporina A (100 ng/ml).

El Ejemplo 2 incluye unos ensayos de validación del sistema de ensayo proporcionado por esta invención en transfección transitoria, así como de la expresión de los genes endógenos en células Jurkat. También se recogen en los Ejemplos 3 y 4 unos ensayos realizados con los clones estables obtenidos, con compuestos inductores e inhibidores de la inducción del promotor de la cox-2.

El sistema de ensayo proporcionado por esta invención es útil en la búsqueda e identificación (screening) de compuestos

inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por diferentes estímulos. Este tipo de inhibidores selectivos de la cox-2 puede tener numerosas aplicaciones terapéuticas potenciales ya que las implicaciones derivadas de la inducción de la cox-2 no sólo inciden en la respuesta inflamatoria, sino también en procesos relacionados con la proliferación celular incontrolada y formación de tumores (por ejemplo, la aparición de adenomas, el cáncer de colon y el desarrollo de pólipos y la angiogénesis, entre otros), con acciones inmunosupresoras y con procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, cabe suponer que los compuestos inhibidores selectivos de la inducción transcripcional de la cox-2 puedan ser útiles como agentes antiinflamatorios, como compuestos capaces de atenuar la proliferación celular incontrolada y/o el proceso de tumorigénesis, como inmunosupresores o como potenciales fármacos con propiedades terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.

La invención también proporciona un método de ensayo para la búsqueda e identificación (screening) de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por un estímulo apropiado (descrito en el Ejemplo 4) que comprende poner en contacto la línea celular proporcionada por esta invención (sistema de ensayo) con el compuesto a ensayar, es decir, con el compuesto cuya potencial actividad inhibidora selectiva de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 se desea ensayar, bajo condiciones que permiten la transcripción de la cox-2, y detectar, y/o medir, la señal indicativa de la expresión de actividad debida al gen testigo. Alternativamente, si se desea, el método de ensayo objeto de esta invención puede llevarse a cabo poniéndose en contacto la línea celular, el sistema de ensayo y un compuesto activador de la inducción transcripcional de la cox-2.

En el método de ensayo proporcionado por esta invención, la regulación de la expresión del gen de la cox-2 viene determinada por la actividad reguladora de su promotor, mientras

que la medida de la actividad del gen testigo proporciona una medida indirecta de la actividad del promotor de la cox-2 en respuesta a diferentes agentes.

El método de ensayo para la búsqueda e identificación de compuestos inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional de la cox-2 por un estímulo apropiado proporcionado por esta invención permite seleccionar compuestos que inhiben la producción de la cox-2 mediante un criterio que radica en la inhibición de la actividad inducible del promotor de la cox-2, con lo cual no se seleccionan aquellos compuestos que inhiban la actividad basal fisiológica de producción de la cox-2.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar formas preferidas de realizar la invención sin que deban ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de una construcción de DNA que comprende una secuencia del promotor de la cox-2 y el gen de la luciferasa

1.1 Clonaje del promotor de la cox-2

En primer lugar se procedió al clonaje de la secuencia promotora del gen humano de la cox-2, a partir de la secuencia descrita por Tazawa [Tazawa et al., 1994] representada en la Figura 1.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos cebadores o "primers" diseñados para la amplificación selectiva del fragmento de DNA correspondiente a la secuencia promotora de este gen. Como DNA molde se utilizó DNA genómico de la línea celular linfocítica humana Jurkat. Los oligonucleótidos utilizados fueron los identificados como SEC.ID.Nº.: 1 y SEC.ID.No.: 2 [véase el apartado relativo a la LISTA DE SECUENCIAS].

Estos oligonucleótidos amplifican una secuencia que abarca desde el nucleótido -1796 al nucleótido +104 de la zona

promotora del gen *cox-2* (véase la Figura 1). Para la reacción de PCR se usó el *Advantage cDNA PCR kit* [Clontech] con 30 ciclos repetitivos de 45 segundos a 94°C y 3 minutos a 68°C en un termociclador PTC-200 [MJ Research].

5

1.2 Construcción del vector de expresión

Los fragmentos generados tras la amplificación fueron subclonados en el plásmido pXP2 [Nordeen, 1988] que contiene la secuencia codificante del gen de la luciferasa que se utilizará como gen testigo (véase la Figura 2). Los oligonucleótidos se diseñaron de tal forma que en el extremo 5' contienen una secuencia adicional de reconocimiento por enzimas de restricción. Tras la amplificación se generan extremos de doble cadena que contienen las dianas de restricción BamHI en el extremo 5' y BglII en el extremo 3'. El vector pXP2 contiene en el sitio múltiple de clonaje una diana BglII, que genera extremos compatibles tanto con extremos BglII como BamHI. Tras la digestión con los enzimas BglII y BamHI del inserto obtenido por PCR conteniendo la secuencia promotora, y del vector pXP2 con BglII, se procedió a la ligación de estas secuencias. De este modo se obtuvo el plásmido prom2-1906-LUC en el que la secuencia (-)1796-(+)104 del promotor de la *cox-2* se sitúa por delante del gen de la luciferasa, dirigiendo su expresión. Esta construcción se secuenció para comprobar la fidelidad de la secuencia del promotor y verificar el sitio de clonaje.

25

Ejemplo 2

30

Experimentos de análisis de la regulación de la actividad del promotor de la *cox-2* mediante experimentos de RT-PCR y de transfección transitoria de la construcción prom2-1906-LUC en la línea celular Jurkat

35

Con el fin de estudiar la regulación de la expresión del gen *cox-2* endógeno en la línea celular Jurkat se procedió al análisis de la expresión de su mRNA mediante experimentos de RT-

PCR. A su vez, con el fin de validar la construcción prom2-1906-LUC y comprobar que la regulación del promotor clonado se corresponde con la esperada, se realizaron experimentos de transfección transitoria de la construcción prom2-1906-LUC utilizando la línea celular Jurkat. En ambos experimentos las células se trataron con compuestos estimuladores e inhibidores de la inducción del promotor de cox-2.

El tratamiento con compuestos activadores se llevó a cabo utilizando el éster de forbol PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (10 ng/ml) (Sigma) y la combinación de PMA y el ionóforo de Calcio A23187 (1µM) (Sigma), en adelante PMA+Ion.

El tratamiento con fármacos inhibidores de la inducción por PMA+Ion se llevó a cabo con ciclosporina A (CsA) (100 ng/ml) o el glucocorticoide sintético Dexametasona (Dex) (1µM) (Sigma).

2.1 Regulación de la expresión del mRNA de cox-2 en células Jurkat

Los resultados obtenidos del análisis por RT-PCR de la expresión del mRNA de cox-2 en células Jurkat se muestran en la Figura 3, donde puede observarse lo siguiente:

a) el tratamiento con PMA (10 ng/ml) produce un ligero incremento de la expresión del mRNA de cox-2, mientras que el tratamiento combinado con PMA+Ion produce el mayor aumento en la expresión de este gen a nivel transcripcional [Figura 3(A)]

y b) la inhibición por CsA (100 ng/ml) de la inducción transcripcional de cox-2 [Figura 3(B)].

Como control en ambos casos se muestra el resultado obtenido para los mRNAs no inducibles de la isoforma cox-1 y de la glicerol aldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

2.2 Evaluación de la actividad luciferasa bajo diferentes estímulos

Se ha analizado la actividad luciferasa en células Jurkat transfectadas transitoriamente con la construcción prom2-1906-

Como control no inducible se utilizó una construcción similar en la que en lugar del promotor de la cox-2 se situó el promotor de la isoforma cox-1 [prom1-898-LUC] y con el vector vacío pXP2.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. Como puede apreciarse en dicha figura, los resultados obtenidos en este ensayo son comparables a los obtenidos en el análisis del mRNA de cox-2 [Ejemplo 2.1], es decir, el tratamiento con PMA+Ion produce el mayor aumento en el número de veces de inducción de la actividad luciferasa (aproximadamente 12 veces la basal). Estos datos demuestran que la secuencia promotora clonada se comporta de forma similar al gen endógeno. Como control se comprueba que tanto la construcción prom1-898-LUG como el plásmido vacío pXP2 no son inducibles.

Se ha analizado la inhibición de la estimulación por PMA (10 ng/m) (Sigma) o PMA+Ion (1 μ M) (Sigma) sobre la actividad luciferasa en células Jurkat transfectadas transitoriamente con la construcción prom2-1906-LUC, mediante el empleo del fármaco inmunosupresor ciclosporina A (CsA) (100 ng/ml). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5 donde se pone de manifiesto que el tratamiento con CsA (100 ng/ml) disminuye la estimulación del promotor de la cox-2 en respuesta a PMA+Ion hasta valores similares a los basales.

Asimismo, se ha analizado la inhibición de la estimulación por PMA+Ion (1 μ M) (Sigma) sobre la actividad luciferasa en células Jurkat transfectadas transitoriamente con la construcción prom2-1906 mediante el glucocorticoide dexametasona (1 μ M) (Sigma). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6 donde se pone de manifiesto que el tratamiento con dexametasona (1 μ M) (Dex) disminuye la estimulación del promotor de cox-2 en respuesta a PMA+Ion.

Ejemplo 3

Obtención de una línea celular que expresa de forma estable una construcción de DNA que comprende una secuencia promotora de cox-2 y el gen de la luciferasa.

Para la creación de la línea celular que expresa de forma estable la construcción prom2-1906-LUC, se cotransfectaron células Jurkat con el vector prom2-1906-LUC y un vector denominado pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) que contiene el gen de resistencia a la higromicina. La transfección se realizó mediante la técnica de electroporación en cubetas de 0,4 cm² (BioRad) con 15×10^6 células en 0,5 ml de medio completo [medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal, L-Glutamina 2 mM y una mezcla de antibióticos] (Todos estos productos fueron adquiridos a Life Technologies). Las células se incubaron en hielo durante 10 minutos con 25 μ g del plásmido prom2-1906-LUC y 5 μ g del vector pCDNA3.1./Hygro. Tras este periodo, las células se electroporaron en un aparato Gene Pulser II (BioRad) a 1.500 μ Faradios de capacitancia y 280 Voltios de corriente. A continuación, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos antes de añadir 10 ml de medio completo. Las células se cultivaron en este medio en frascos de cultivo (Nunc) de 75 cm² durante 48 horas en un incubador de células a 37°C, con una humedad del 95% y 5% de CO₂. En este momento se cambió el medio por medio completo sin antibióticos al que se añadió higromicina (Boehringer Mannheim) a una concentración de 200 μ g/ml. Las

células se cultivaron en este medio durante 30 días con sucesivos cambios de medio. Durante este periodo se selecciona la población resistente que sobrevive al tratamiento con el antibiótico selectivo, es decir los transfectantes estables para el gen de resistencia al antibiótico higromicina. En esta población se analizó la expresión del gen de la luciferasa con el fin de determinar la presencia de transfectantes estables para el plásmido prom2-1906-LUC. Para ello, 1×10^6 células se lisaron en 50 μ l de tampón de lisis (Promega) y con los extractos obtenidos se procedió a determinar la actividad luciferasa con los reactivos contenidos en el kit de "Luciferase Assay System" [Promega]. La medición de la emisión de luz producida se determinó en un luminómetro MonoLight 2010 (Analytical Luminiscence Laboratory) con un sistema de inyección automática de 100 μ l de reactivo.

De esta población policlonal (Jurkat-pool-1906LUC) se realizó una dilución límite en placas de 96 pocillos en medio completo con higromicina con el fin de obtener clones individuales que expresaran el gen de la luciferasa de forma estable. Estos clones se crecieron hasta obtener al menos 1×10^6 células con las que realizar la medición de la actividad luciferasa tal como se ha descrito anteriormente. De esta forma se obtuvieron tres clones individuales denominados Jurkat-C3-1906LUC, Jurkat-F9-1906LUC y Jurkat-C7-1906LUC. En estos clones se determinó la actividad luciferasa basal en RLUs (unidades relativas de luminiscencia) y se comprobó que la expresión del testigo luciferasa se inducía en respuesta a los mismos estímulos que el promotor de cox-2 tal y como se había establecido previamente con células transfectadas de forma transitoria (véase la Figura 7). En los tres clones, los valores basales de actividad luciferasa se incrementan de 3 a 6 veces con un tratamiento de 6 horas con el éster de forbol PMA y hasta 10 - 20 veces con un tratamiento combinado de PMA+Ion, de forma similar a los resultados obtenidos en las transfecciones transitorias.

Ejemplo 4

Establecimiento de un sistema de ensayo de compuestos que regulan la expresión del gen *cox-2* en los clones de la línea celular que expresa de forma estable una construcción de DNA que comprende una secuencia promotora de *cox-2* y el gen de la luciferasa.

Los clones se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células en 200 μ l de medio RPMI suplementado con 2% de suero fetal, L-Glutamina 2 mM y una mezcla de antibióticos. Las células se trataron durante 6 horas con diferentes concentraciones de los compuestos cuya actividad se pretende ensayar. En el caso del ensayo de la actividad de estos compuestos sobre la inducción de la actividad del promotor de *cox-2*, las células se trataron con PMA+Ion durante 5 horas, tras 1 hora de pretratamiento con el compuesto a ensayar. Tras este periodo las células se lisaron en 50 μ l de tampón de lisis y se determinó su actividad luciferasa utilizando 20 μ l en un luminómetro tal y como se describió en el Ejemplo 2.2. A continuación se muestran algunos resultados obtenidos con compuestos previamente descritos como inhibidores de la estimulación del promotor de *cox-2*.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos con el compuesto ciclosporina A (CsA) el cual produce una inhibición de la estimulación obtenida con PMA+Ion en los clones estables de Jurkat, de forma similar a lo previamente descrito (Iñiguez et al., 1998), y a lo observado en las transfecciones transitorias ilustradas en el Ejemplo 2.3.

La Figura 9 muestra los resultados obtenidos con el compuesto Dexametasona (Dex), que, como glucocorticoide y anti-inflamatorio, produce una inhibición de la estimulación obtenida con PMA+Ion en los clones estables de Jurkat, como corresponde a lo ya descrito (Smith and DeWitt, 1996) y a lo observado previamente en las transfecciones transitorias del Ejemplo 2.3.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos con el

compuesto Resveratrol (Res), descrito recientemente como inhibidor de la estimulación por PMA del gen cox-2 (Subbaramiah, et al., 1998). Este compuesto produce una inhibición de la estimulación obtenida con PMA+Ion en los clones estables de Jurkat.

De esta forma queda demostrada la validez del sistema de ensayo por el comportamiento similar de los clones obtenidos, de las transfecciones transitorias y de los resultados obtenidos con el mRNA endógeno. Con el uso de compuestos cuya actividad sobre el promotor de cox-2 es conocida, ya sean estimuladores o inhibidores, queda establecido que es posible detectar compuestos no descritos previamente que regulen tanto positivamente como negativamente la expresión basal o inducida del gen cox-2 con el sistema de ensayo desarrollado en la presente invención.

DEPOSITO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Una muestra de una línea celular Jurkat, denominada J-1906-F9, que expresa de forma estable una construcción de DNA que comprende una secuencia promotora del gen de la cox-2 y el gen de la luciferasa, ha sido depositada en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) [Salisbury, R. Unido] el 24 de marzo de 1999 y ha recibido el número de acceso ECACC 99032405.

Una muestra del plásmido prom2-1906-LUC, insertado en *Escherichia coli* DH5, denominada DH5 prom2-1906-LUC, ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) [Burjassot, Valencia] el 24 de marzo de 1999 y ha recibido el número de acceso CECT 5145.

BIBLIOGRAFÍA

Berg, J., Christoph, T., Widerna, M., and Bodenteich, A. 1997. Isoenzyme-specific cyclooxygenase inhibitors: a whole cell assay system using the human erythroleukemic cell line HEL and the human monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 37: 179-86.

Brideau, C., Kargman, S., Liu S., Dallob A.L., Enrich E.W., Rodger, I.W., And Chan C.C. 1996. A human whole cell assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm. Res.* 45: 68-74.

- 5 Cromlish W.A., and Kennedy, B.P. 1996. Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1777-85.

Famaey, J.P. 1997. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview. *Inflamm. Res.* 46: 437-446.

Griswold, D.E., and Adams, J.L. 1996. Constitutive cyclooxygenase (cox-1) and inducible cyclooxygenase (cox-2): Rationale for selective inhibition and progress to date. *Med. Res. Rev.* 16: 181.

- 15 Hall, V.C., and Wolf, R.E. 1997. Effect of Tenidap and nonsteroidal antiinflammatory drugs on the response of cultured human T cells to interleukin 2 in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 24:1467.

20 Iñiguez, M.A., Punzón, C., and Fresno, M. 1998. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes; regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. Enviado a publicar.

Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., and Netter, P. 1997. Cyclooxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 53: 563.

30 Lora, M., Morisset, S., Menard, H.A., Leduc, R., and de Brum-Fernandes, A.J. 1997. Expression of recombinant human cyclooxygenase isoenzymes in transfected COS-7 cells in vitro and inhibition by tenoxicam, indomethacin and aspirin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 56: 361-7.

Nordeen, S.K. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6: 454-457.

35 Noreen, Y., Ringbom, T., Perera, P., Danielson, H., And Bohlin, L. 1998. Development of a radiochemical cyclooxygenase-1

and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 61: 2-7.

O'Neill, G.P., Kennedy, B.P. Mancini, J.A., Kargman, S., Ouellet, M., Yergey, J., Falgoutyret, J.P., Cromlish, W.A., Payett, P., Chan, C.C. et al. 1995. Selective inhibitors of Cox-2. *Agents Actions Suppl.* 46: 159-68.

Pasinetti, G.M. 1998. Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease. Experimental approaches and clinical interventions. *J. Neurosci. Res.* 54: 1-6.

Schneider U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodkin lymphoma. *Int. J. Cancer*, 19:521-6.

Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S.C., Isakson, P., Coffey, R.J., Morrow, J., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. 1997. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 99: 2254-2259.

Shiff, S.J., Koutsos, M.I., Qiao, L., and Rigas, B. 1996. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effect on cell cycle and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 222, 179-188.

Smith, W.L., and DeWitt, D.L. 1996. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 and -2. *Adv. Immunol.* 62:167.

Subbaramiah, K., Chung, W.J., Michualart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J.M., and Dannenberg, A.J. 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol-ester treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273: 21875-882.

Tao, X., Schulze-Koops, H., Ma, L., Cai, J., Mao, Y., and Lipsky, P.E. 1998. Effects of *Tripterygium wilfordii* hook extracts on induction of cyclooxygenase 2 activity and prostaglandin E2 production. *Arthritis Rheum.* 41: 130-8.

Tazawa, R., Xu, X.M., Wu, K.K., and Wang, L.H. 1994. Characterization of the genomic structure, chromosomal location

and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 203:190-194.

5 Tsujii M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Matsatsugu, H., and DuBois, R.N. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716.

Tsujii, M., Kawano, S., and DuBois, R.N. 1997. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3336-40.

10 Zhou, L., Ritchie, D., Wang, E.Y., Barbone, A.G., Argentier D., And Lau, C.Y. 1994. Tepoxalin, a novel immunosuppressive agent with a different mechanism of action from cyclosporin A. *J. Immunol.* 153:5026.

B

S

S

S

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- 5 (A) NOMBRE: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.
(B) DIRECCION: Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221
(C) CIUDAD: Barcelona
(E) PAIS: España
(F) CODIGO POSTAL: 08041
10 (G) TELEFONO: 93 446 60 00
(H) TELEFAX: 93 450 32 02

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

- 15 LINEA CELULAR QUE COMPRENDE EL PROMOTOR DE LA
CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y UN GEN TESTIGO, Y SU EMPLEO EN:
LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA INDUCCIÓN...
TRANSCRIPCIONAL DE COX-2

- 20 (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) MEDIO: Diskete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPO)

(2) INFORMACION DE LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° [SEC.ID.N°]: 1:

- 30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 nucleótidos
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal

- 35 (ii) TIPO DE MOLECULA: DNA

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:
GGGGGATCCG GATTCTAACA TGGCTTCTAA CCC 33

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 2:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLECULA: DNA

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 2:

GGGAGATCTG GTAGGCTTTG CTGTCTGAGG 30

5

9

5

9

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de DNA que comprende la totalidad o parte de una secuencia promotora del gen de la ciclooxigenasa 2 (cox-2) y un gen testigo, operativamente unidos entre sí, de manera que dicha secuencia promotora del gen de la cox-2 dirige la expresión de dicho gen testigo en respuesta a un estímulo adecuado.

2. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia promotora del gen cox-2 procede del gen humano de la cox-2.

3. Construcción según la reivindicación 2, en la que dicha secuencia promotora del gen cox-2 está constituida por la secuencia comprendida entre el nucleótido (-)1796 y el nucleótido (+)104 del promotor de la cox-2 humana.

4. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicho gen testigo se selecciona entre el gen de la luciferasa, el gen de la cloranfenicol acetil transferasa y el gen de la beta galactosidasa.

5. Un vector que comprende una construcción de DNA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Una línea celular que comprende una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o transformada con un vector según la reivindicación 5.

7. Una línea celular según la reivindicación 6, en la que dicha línea celular deriva de una línea celular de origen humano.

8. Una línea celular según la reivindicación 7, en la que

dicha línea celular de origen humano es una línea de células Jurkat.

- 5 9. Método de ensayo para la búsqueda de compuestos
inhibidores selectivos de la inducción a nivel transcripcional
de la ciclooxigenasa-2 por un estímulo apropiado, que comprende
poner en contacto una línea celular según cualquiera de las
reivindicaciones 6 a 8, con un compuesto cuya potencial
actividad inhibidora selectiva de la inducción a nivel
10 transcripcional de la cox-2 se desea ensayar, bajo condiciones
que permiten la transcripción de la cox-2, y detectar, y/o
medir, la señal indicativa de la expresión de actividad debida
al gen testigo.

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

-1841 GAATTCAGGATTGAATGTAAAAATTTTAGTACTCTCTCACAGTATGGATTCTAACATGGCTTCTAACCXAACTAACATTAGTAGCTCTAACTATAAACT
Oligonucleótido n° 1

-1741 TCAAATTTTCAGTAGATGCAACCTACTCCTTTAAAATGAAACAGAAGATTGAAATTATTAATATCAAAAAGAAAATGATCCACGCCTCTTAGTTGAAATT

-1641 TCATGTAAGATTCCATGCAATAAATAGGAGTGCCATAAATGGAATGATGAAATATGACTAGAGGAGGAGAAAAGGCTTCCTAGATGAGATGGAATTTTAGT

-1541 CATCCGTGTCATGAAAGATCAGATGTGTACACTAAGCAAAACAGTTAAAAAAAAAACCTCCAAGTGAGTCTCTTATTATTTTTTTCTTATAAGACTT

-1441 CTACAATTTGAGGTACCTGGTGTAGTTTTATTTCAGGTTTTATGCTGTCAATTTTCTGTAATGCTAAGGACTTAGGACATAACTGAAATTTTCTATTTTCC

-1341 ACTTCTTTTCTGGTGTGTGTGTATATATATATATATACACACACATATACATATATATATTTTTTAGTATCTCACCCCTCATGCTCCTCCCTGA

-1241 GCACTACCCATGATAGATGTTAAACAAAAGCAAAGATGAAATTCACCTGTTAAATCTCCCTTCCATCTAATTAATTCCTCATCCAACATGTGCCAA

-1141 ACGAGAATAGAAAAATTAGCCCCAATAAGCCCAGGCAACTGAAAAGTAAATGCTATGTTGTACTTTGATCCATGGTCACAACCTCATAATCTTGAAAAAGTG

-1041 GACAGAAAAGACAAAAGAGTGAACTTTAAAACTCGAATTTATTTTACCAGTATCTCCTATGAAGGGCTAGTAACCAAAATAATCCACGCATCAGGGAGAG

-941 AAATGCCTTAAGGCATACGTTTTTGACATTTAGCGTCCCTGCAAATTCGCGCATCGCCGCTTCCTTTTGCCATCAGAAGGCAGGAACTTTATATTGGT

-841 GACCCGTGGAGCTCACAATTAATTTTACAGGGTAACGCTTAGGACCAGTATTATGAGGAGGATTACCTTTCCCGCTCTCTTTTCCAAGAAAACAAGGA

-741 GGGGGTGAAGGTACGGAGAACAGTATTTCTTCTGTTGAAAGCAACTTAGCTACAAAGATAAATTACAGCTATGTACACTGAAGGTAGCTATTTTCATTCCA

-641 CAAAATAAGAGTTTTTTAAAAAGCTATGTATGTATGTCCTGCATATAGAGCAGATATACAGCCTATTAAGCGTCGTCCTAAAAACATAAAACATGTGACG

-541 CTTTCTTAACCTTACTCGCCCCAGTCTGTCCCGAGCTGACTTCTCGACCTCTAAAGACGTACAGACCAGACACGGCGGCGGCGGGGAGAGGGGATT

-441 CCTGCGCCCCCGGACCTCAGGGCCGCTCAGATTCTTGAGAGGAAAGCCAAAGTGTCTTCTGCCCTCCCCGGTATCCCATCCAAGCGCATCAGTCCAGA

-341 ACTGGCTCTCGGAAGCGCTCGGGCAAAGACTGCGAAGAAGAAAAGACATCTGGCGGAAACCTGTGCGCTGGGCGGTGGAACCTCGGGGAGGAGAGGGAG

-241 GGATCAGACAGGAGAGTGGGGACTACCCCTCTGCTCCCAATTTGGGGCAGCTTCTGGGTTTCCGATTTTCTATTTCCTGGGTAAAAAACCTTGCCC

-141 CCACCGGGCTTACGCAATTTTTTTAAGGGGAGAGGAGGGAATTTGTGGGGGTACGAAAAGCGGAAAAGAAACAGTCATTTCTGTCACATGGGCTTGG

+1

-41 TTTTCAGTCTTATAAAAAGGAAGTTCTCTCGGTAGCGACCAATTGTGCATACGACTTGCAGTGAGCGTCAGGAGCAGCTCCAGGAACTCCTCAGCAGCG

+60 CTCCTCTCAGCTCCACAGCCAGACGCCCTCAGACAGCAAAAGCCTACCCCCCGCGCGCGCCCTGCCCCGCTGCGATG

Oligonucleótido n° 2

FIG. 1

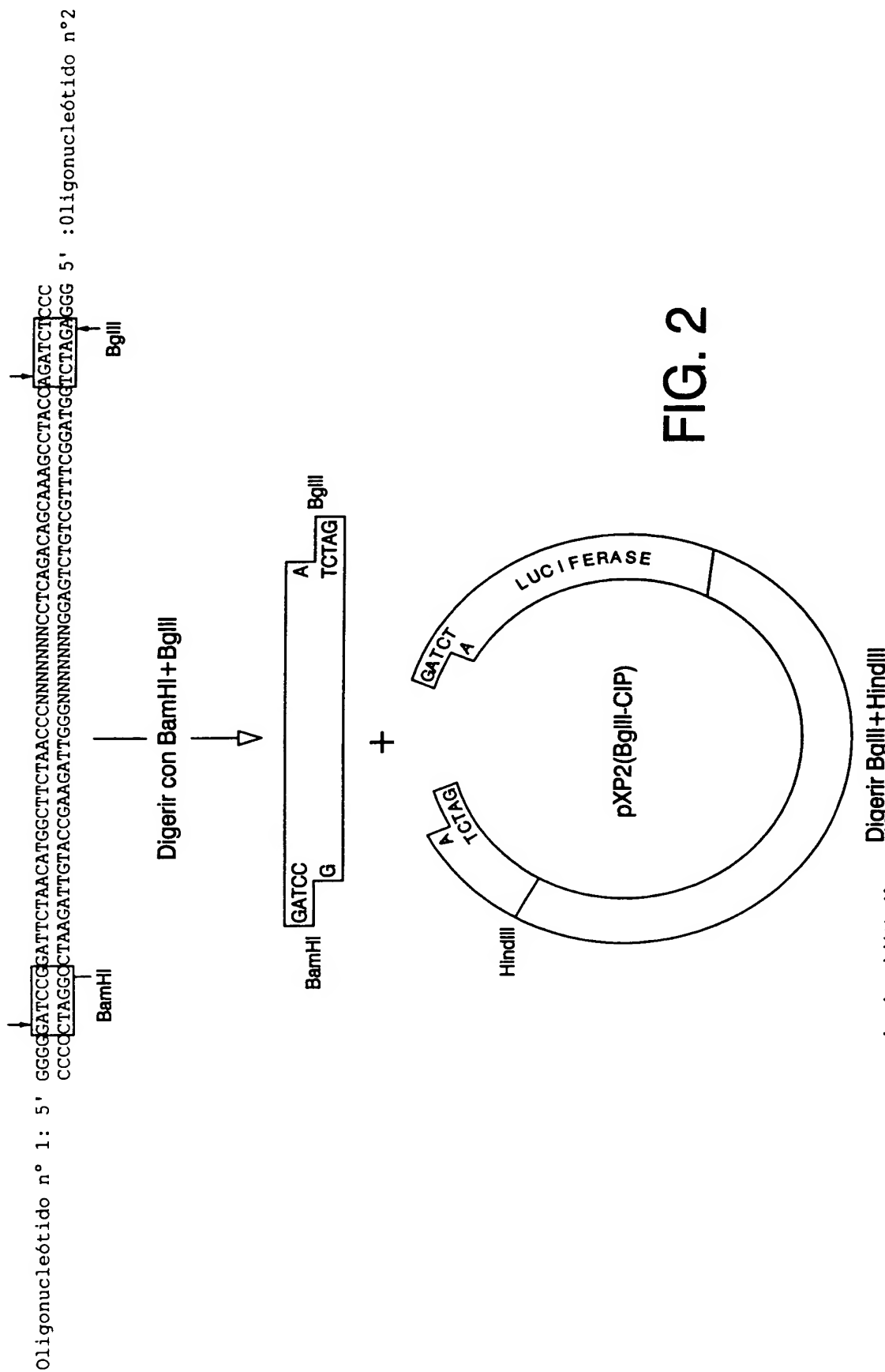


FIG. 2

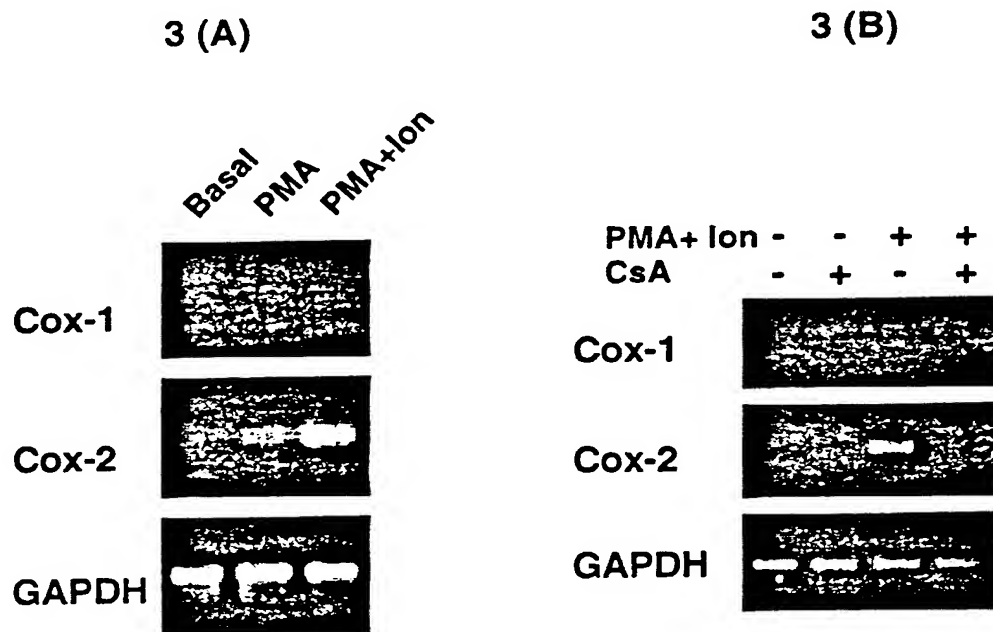


FIG. 3

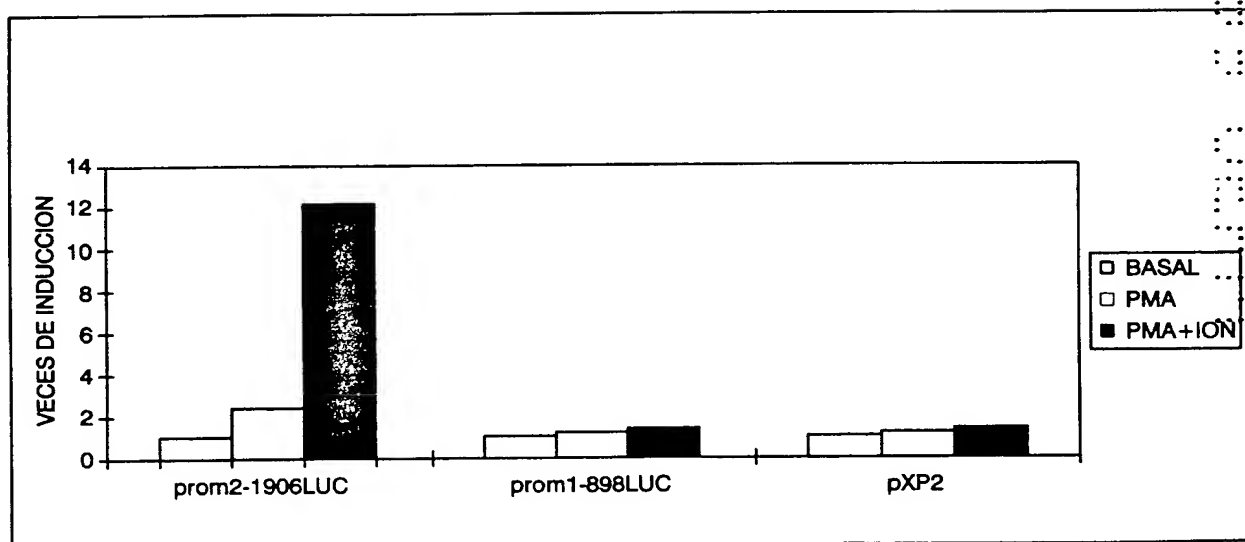


FIG. 4

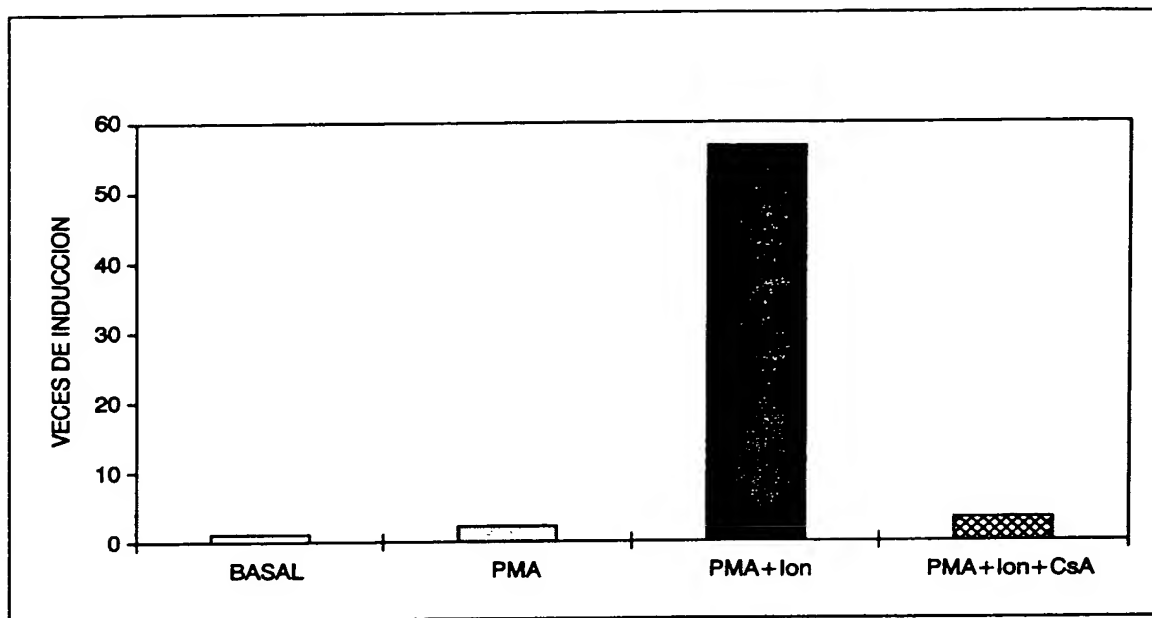


FIG. 5

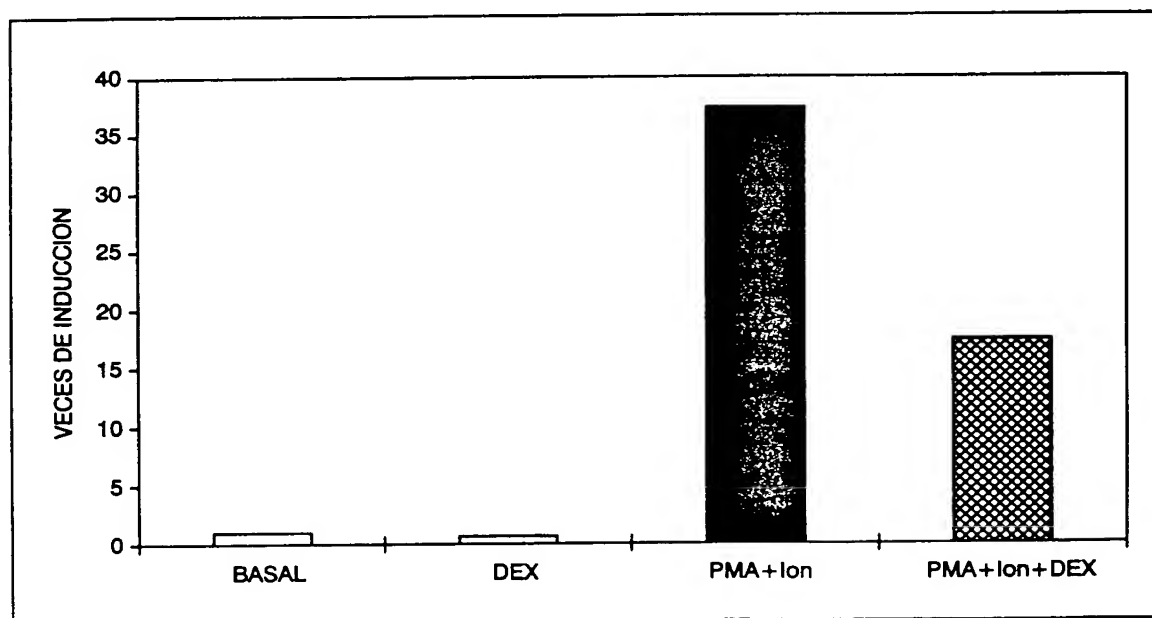


FIG. 6

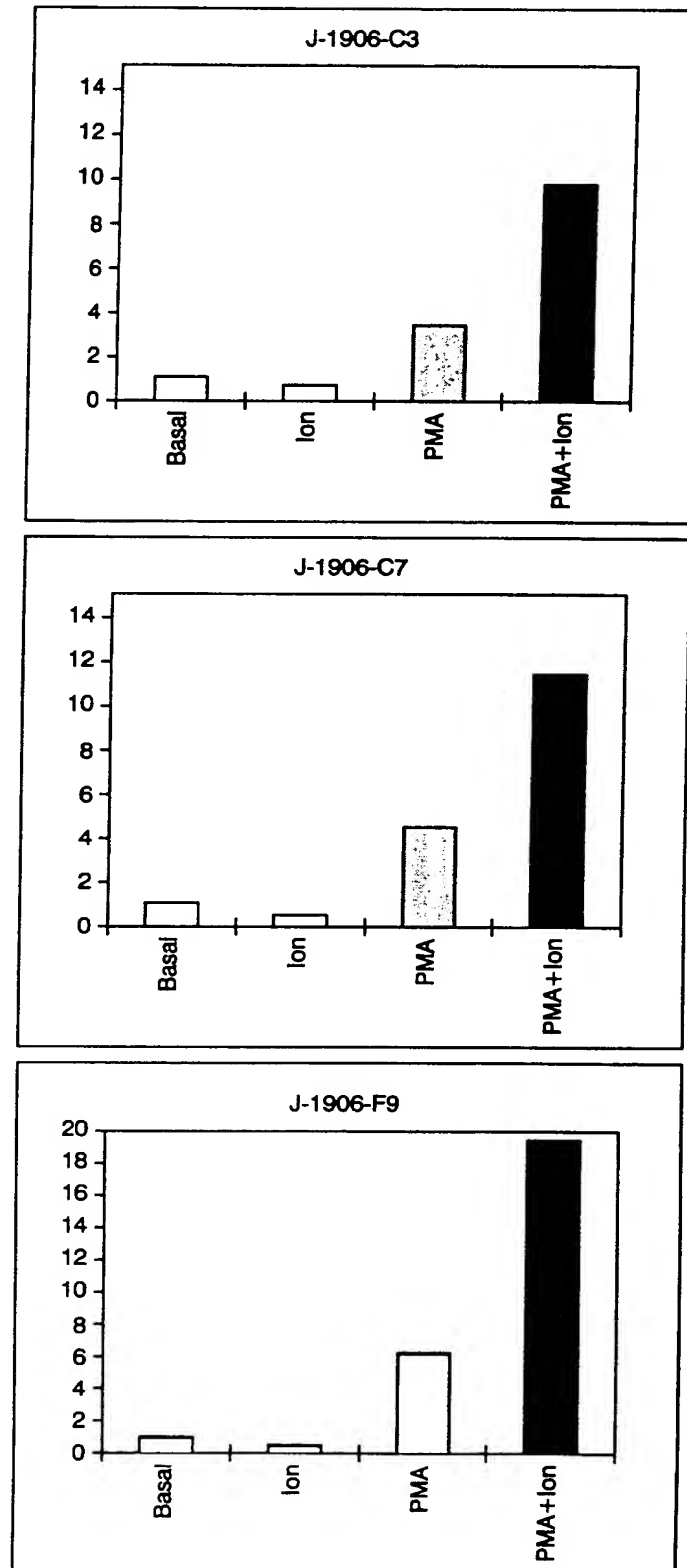


FIG. 7

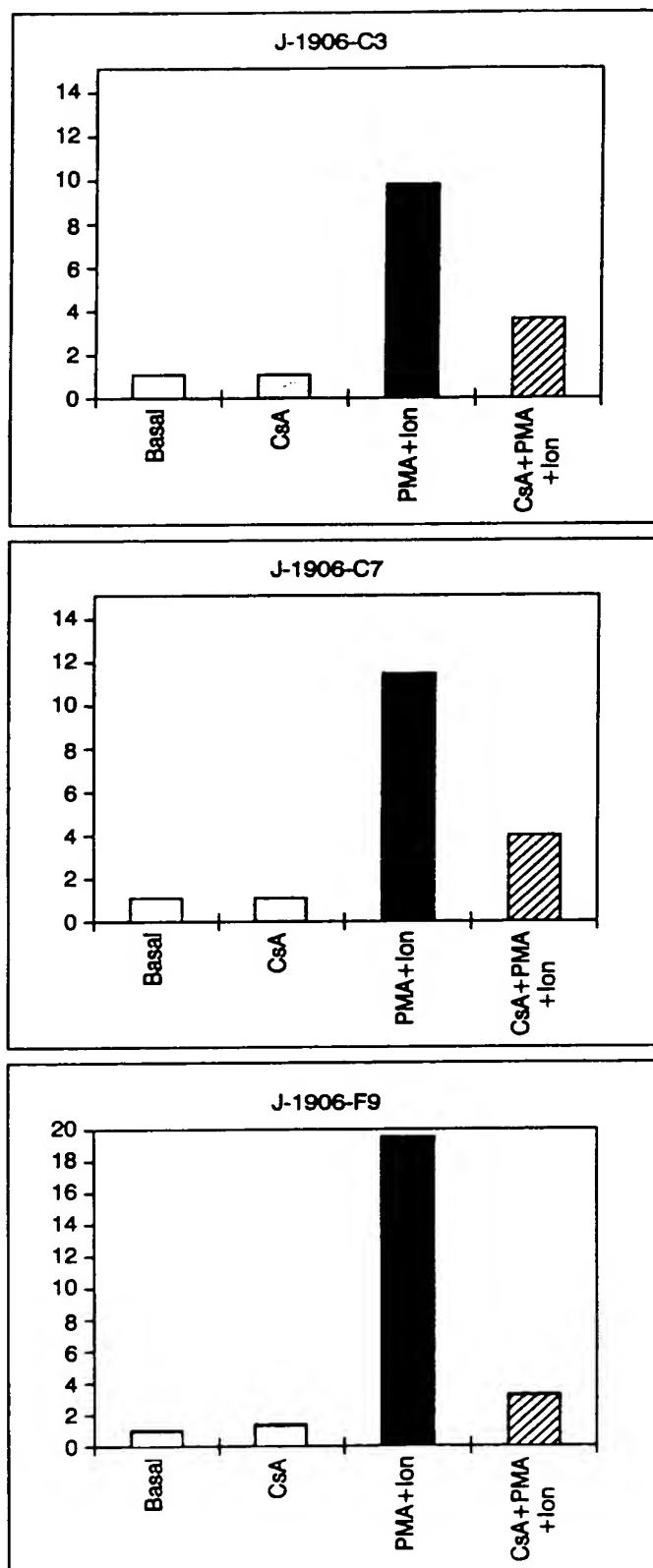


FIG. 8

1990 05 01 10 53

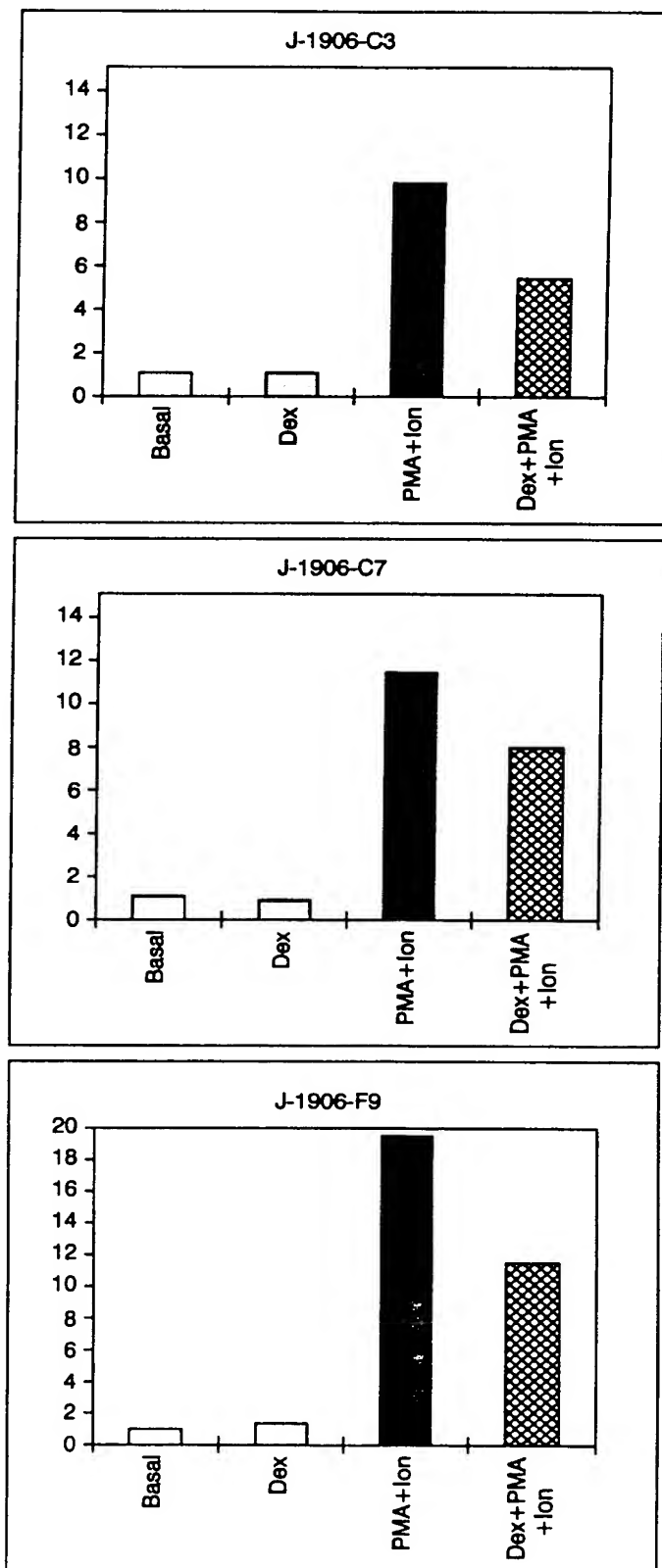


FIG. 9

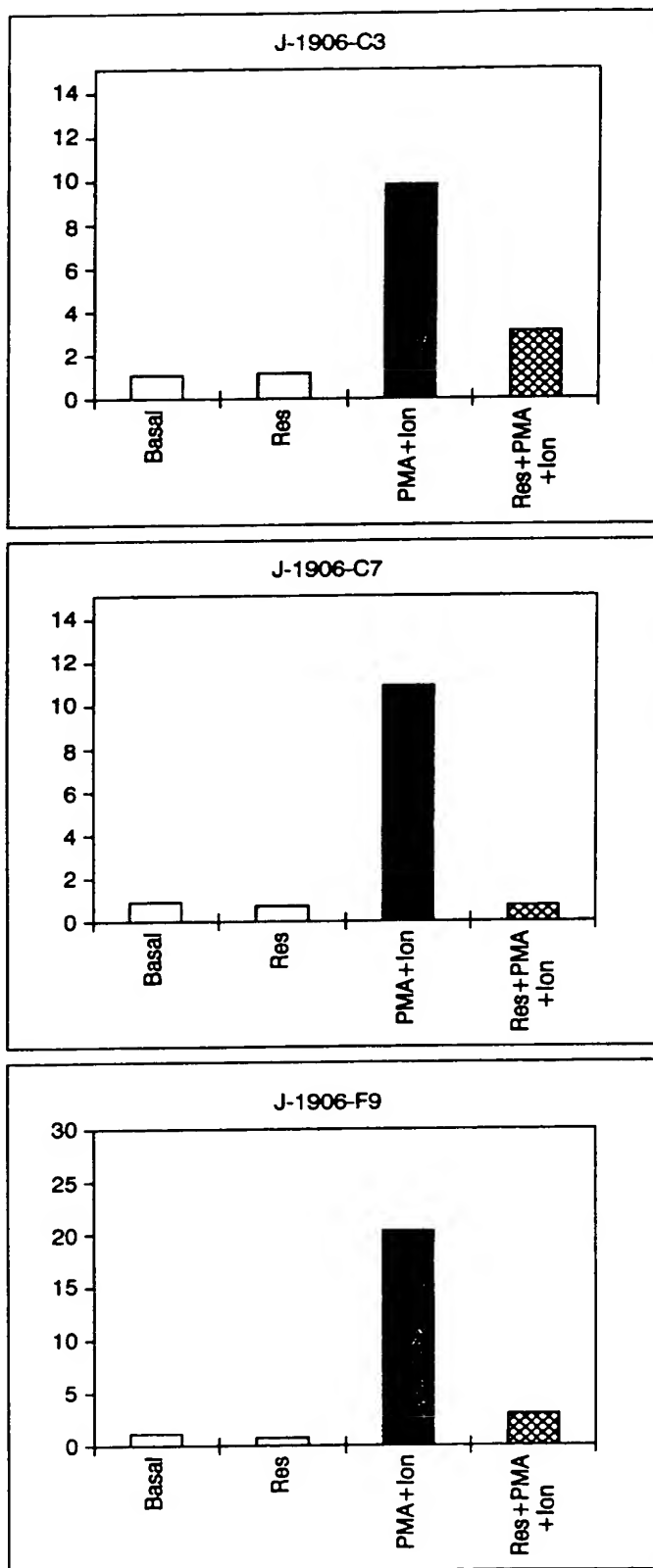


FIG. 10

